⑩日本国特許庁(JP)

訂存に有り

四公開特許公報(A)

平2-311498

Solnt. Cl. 5

.4

識別配号

庁内整理番号

❸公開 平成2年(1990)12月27日

C 07 K 13/00 C 12 N 1/21 ZNA 8619-4H

6807-4B 8717-4B C 12 N 15/00

Α×

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全15頁)

会発明の名称

機能性ポリペプチド

②特 頤 平1-131453

愛出 頤 平1(1989)5月26日

@発明者 田口

由起

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研

究所内

@発明者 大館

洋一

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研

究所内

②発明者 川瀬

靖聡

究所内

⑫発明者後藤

晶 —

送賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研

究所内

勿出 顋 人 賽酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

10代 理 人 弁理士 中 本 宏

外2名

最終頁に続く

明如警

1. 発明の名称

機能性ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1. ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインと、ヘバリン結合ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合していることを特徴とする機能性ポリペプチド。

2. 下記一般式1:

Cz+++ Net → Rz+1-X … (1)

[式中Cz++は、ヒトフイブロネクチンの細胞接着ドメインのPro¹²²³-Ser¹³¹³ に相当する
277 アミノ酸ペプチド残基を示し、下記式
II:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser lle Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

Pro Gly Thr Glu Tyr Yal Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly 11e Asp Phe Ser Asp 11e Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp lle Ala Pro Arg Ala The Ile The Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly . Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser lle Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly The Glu Tyr Val Val Ser ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu lie Gly Gin Gin Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala The Pro The See Leu Leu Ile See Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg the Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gin Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala

Ser Ser Lys Pro lie Ser lie Asn Tyr Arg Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser … 〔□〕 で表される配列を有し、II。」はヒトフイプロ ネクチンのヘパリン結合ドメインのAla'***-Thr'*** に相当する 271アミノ酸ペプチド段 基を示し、下記式□:

Ala ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
Thr Glo Vai Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
Glo Trp Thr Pro Pro Aso Val Glo Leu Thr
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glo
Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu lle Aso Leu
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Glo Gly Val Val Thr Thr
Leu Glu Aso Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr lle
Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
lie Thr Gly Phe Glo Val Asp Ala Val Pro

ニン残器を示し、nは1又は零の数を示す〕 で表されることを特徴とする機能性ポリペプ チド。

- 3. 請求項 1 記載の機能性ポリペプチドをコードする D N A を含有せしめた組換え体プラスミド。
- 4. 請求項3記載の租後え体プラスミドを導入せしめた形質転換体。
- 5. 請求項 4 記載の形質転換体を培養し、該培養物より請求項 1 記載の機能性ポリペプチドを採取することを特徴とする機能性ポリペプチンチンの製造方法。
- 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインペプチドと、ヘパリン結合ドメインペプチドとを含有する新規な機能性ポリペプチド及びその製造方法に関する。

〔従来の技術〕

Ille Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ille
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
Ille Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
Arg Ser Ser Pro Val Val Ille Asp Ala Ser
Thr Ala Ille Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg
Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu
Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ille
Thr Gly Tyr Ille Ille Lys Tyr Glu Lys Pro
Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ille
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
Ille Tyr Val Ille Ala Leu Lys Asn Asn Gin
Lys Ser Glu Pro Leu Ille Gly Arg Lys Lys
Thr

で表される配列を有し、Xは下記式IV:
Asp-Glu-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-He-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr (IV)
で表されるペプチド残基、あるいはその一部
又は全部が欠失した基を示し、Net はメチオ

[発明が解決しようとする課題]

FNにはヘパリンに結合する領域(ヘパリン 結合ドメイン)が2ヶ所存在し、1ヶ所はN末 望付近にあり、結合にCaイオンが必要であるこ とが知られている。もう一方の領域はC末館付 近にあり、この領域のヘパリンに対する結合活 性は、前述の領域よりも強く、 しかも Caイオンに影響されない。

本発明の目的は、FNの細胞接着活性とへパリン結合活性の両機能を併せ持つ、新規な機能性ポリペプチド、及びその有利な製造方法を提供することにある。

[課題を解決するための手段]

両方の活性を有すること、更に、BHKやNR K細胞に対する細胞伸展活性が、細胞接着ドメ イン単独の場合に比べて増強されていることを 見出した。

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明者らは、和胞伸展活性とヘバリン結合活性を致ね備えた新規ポリペプチドの科袋及切をの製造方法について研究し、ヒトドの加密接着ドメインとヘバリン結合ドメインが直接を加速したがある。 はリンカーペプチドを遺伝子工学的に作製した。 この新規な機能性ポリペプチドの生物活性を調べた結果、細胞伸展活性とヘバリン結合活性の

pTF7021 を用いることができる。pTF7021 はFNのPro'****-Net'**' (279アミノ酸残基)を発現するプラスミドである。pTF7021 の翻訳領域のC末端の終止コドンの直前にクローニングサイト、例えば Ncol サイトを導入することにより、細胞接着ドメインのcDNAと他のドメインのcDNAを連結させることができる。

本発明による新規な機能性ポリペプチドの具体例の1つとしては、下記一般式 1:

C371 + Net → 1 N271 - X … 〔1〕

(式中 C371は、ヒト F N の細胞接着ドメインの Pro 1234 - Ser 1515 に相当する 277 アミノ酸ペプチド 強基を示し、下記式 II:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly
Pro Asp Thr Net Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser lle Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser

特別平2-311498 (4)

Ser Val Tyr Glu Gin His Glu Ser Thr Pro teu Arg 61y Arg 61n Lya Thr 61y Leu Asp Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie. The Ala Ann Sor Phe The Val His Trp (le Ala Pro Arg Ala Thr lle Thr Gly Tyr Arg lle Arg His His Pro 61u His Phe Ser Gly Arg Pro Arg. Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Ann Sor He Thr Leu Thr Ann Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser jie Val Ala Leu Asa G.ly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Lau 110 Gly Gla Gla Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Aso Ser. Pro Val Gin Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser. lys Sor Thr Ala Thr lie Sor Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr 11e Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala A --- Sor Sor Lys Provile Sor Ila Asn Tyr Arg

Thr Giu ilo Asp Lys Pro Ser … 〔11〕で汲される配列を有し、Iloniはヒト F Nのヘパリン結合ドメインのAla' ***-Thr' *** に相当する 271アミノ酸ペプチド段基を示し、下記式皿:

Ala ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
Gin Trp Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu ile Asn Leu
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile
Thr ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro

The Cly Leu Gln Pro Gly The Asp Tyr Lys

ile Tyr Leu Tyr The Leu Asn Asp Asn Ala

Arg Ser Ser Pro Val Val ile Asp Ala Ser

The Ala ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg

Phe Leu Ala The The Pro Asn Ser Leu Leu

Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg lle

The Gly Tyr ile lie Lys Tyr Glu Lys Pro

Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg

Pro Arg Pro Gly Val The Glu Ala The lle

The Gly Leu Glu Pro Gly The Glu Tyr The

Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln

Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys

The (M)

で表される配列を有し、Xは下記式IV:

Asp-61u-Lou-Pro-61n-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-His-Pro-Asn-Lou-His-Gly-Pro-Glu-lie-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr ... (IV)

で表されるペプチド幾基、あるいはその一部又 は全部が欠失した基を示し、 Metはメチォニン 競話を示し、nは1又は零の数を示す)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチドが挙 けられる。

ヘバリン結合ドメインについてはトリプシン、 サーモライシン、カテプシンD等によって分解 されて得られた断片が報告されており、その大 きさは、29kDから38kDに及んでいる。ドメイン の詳しい特定はなされていないが、一般的には 約90アミノ酸から成る四型類似配列を3個と、 それに続くII cs型配列の一部を含む断片が知ら れている。本発明の前記式しに記載されている XはUcs型配列の一部に相当する。ヘバリン結 合活性にはII csを必要としないが、ある傾のり ンパ系の細胞の接着には、皿cs配列が必要とす る考え方もある。本発明者らはヘバリン結合ド メインの耳室類似配列を3個含む断片(本発明 の前記式!に記載されている川コテュに相当)と、 更に回csの一部を含む断片(式しの川**;-X)を 大鷗岗で発現させ、ヘバリン結合活性及び細胞 接着活性を測定した結果、両者共、ヘバリン結

合活性を有すると共に、BHK加鉛に対する協 着活性を有しており、更に川。ハーXでは、接着と 仲展活性が増強されていることを見出した。

ヘパリン結合ドメインをコードするcDMAは、 pLP2435 から取出すことができる。pLP2435 は、 前記plP2、plP3、plP4及びplP5から再構築され たプラスミドで、PNのヘバリン結合ドメイン をコードするcDNAを含んでいる。但し、flcs部 分に相当するcDNAは合んでいないので、Xに対 応するDNA配列は化学合成によって概築する 必要がある。pLF2435 から必要なcDNA断片を翻 限酵素で切出し、5′ 飼に開始コドンを含む合 成DNAを、また、3′ 個には、終止コドンを 合む合成DNAをDNAリガーゼで連結した後、 適当な発現ベクターに接続することにより、□ 型類似配列が3個つらなった配列を有するペプ. チドを発現するプラスミドを得ることができる (第1図参照)。すなわち第1図は、川川を発 現するプラスミドp110101を 榊 築 するための工程 図である。

れる(第3図及び第4図参照)。すなわち第3 図は、C277-Net-H271を発現するブラスミド pCH101を構築するための工程図であり、第4図 は、C277-Net-H228を発現するブラスミドpCN 102 を構築するための工程図である。

前記プラスミドにおける連結邸には、 Ncolサイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれる。リンカーの有無は、本発明の効果を左右するものではないが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。

得られたプラスミドを大脇窗に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチムが大隅窗内に碧積される。発現の確認た大田のなが用いられる。紅魚リルアインが用いられる。アクリルアインを選集した後、泳山パクローナル抗体(PN-10、全面造)、及びFNのヘバリンドメインを認識するモノクローナルによくと認識するモノクローナルには、アクロースにおいて、

このプラスミドと、II c8の一部(X)に対応 する化学合成 DNAを組合せることにより、更 にII c8を含むペプチドを発現するプラスミドが 得られる(第2図参照)。すなわち第2図は、 Haseを発現するプラスミド p110102を構築するた めの工程図である。

発現ベクターとしては、既存のものはすべて利用することができるが、例えばpUC118N/pUC119N(pUC) 119N(pUC) 119N(pUC) 223 巻、第 174~180 頁 (1987)、及びその誘導体を用いることにより好により好を決していることによりできる。これらのプラン結果を開闢に導りできる。これらのプラン結合とはよりできる。ないで、の世質を調べることがあっての特別では、からcDNA断片ステトで発現されたのプランに表導されたプラストに接続することにより、アトの細胞接着ドインとへパリン結合ドメインとが連結したポリンに接続することにより、アトの細胞接着ドインとへパリン結合ドメインとが連結したポリステトを発現する組換え体プラスド

するモノクローテル抗体、(IST-1又は IST-2、ベーリンガー社)の両方で検出されるバンドが目的のポリペプチドである。

目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。超換え大脳菌をLープロス等の培地に培養した後、超声被処理により、超路の分離して上荷を得る。上荷を透析後、DBABイオン交換体及び/又はへパリンーアがロース等のアフィニティクロマドを精製することができる。

得られたポリベプチドは、BHKやNRK細胞に対する細胞伸展活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸展活性の測定は、例えばルオスラティ(Reoslahtii)らの方法〔メソッズ イン エンザイモロジー(Methods in Bnzymology)、第82巻、第 803~831 頁(1981)〕に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSAでブロッキングし

たマイターが加える。 日本の動画を形がした。 日本の動画を形がした。 日本の動画を表しているのでは、 日本の動画を表しているのでは、 日本のでは、 日本のできる。 日本のできる。 日本のは、 日本のできる。 日本のできる。 日本のできる。

以上の概定により、得られたポリペプチドが、 BHKやNRK細胞に対して強い細胞伸展活性 を示すと共に、ヘパリンに対しても強い観和性 を示すことが証明される。

〔寒 推 例〕

以下、本発明を実施例により更に具体的に設 男するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

空蚀阀1

-Saci断片を回収した。この断片700 ngと(1-1) で得た5 が 値 アダプター 120ngをT4 DNA り」が一ゼ用パッファー、0.5ml ATP、10ml BTT 及び 2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを含む20μ4の反応被中、16で、一夜インキュベートした。反応被を65で、10分処理した後、lcol 及び Saciで分解し、アガロースゲル電気終動にかけ、0.52 kb の Ncoi-Saci 断片的 120ngを回収した。

(1-3) Sacl-Banii 断片の興戦

FNのヘパリン結合ドメインAla****-Thr***
(2717 ミノ酸鉄誌、以下川-271 と略称する)
をコードするcDNA断片のクローニング(第1図 参照)

(1-1) 合成 DNAアダプターの類製

ヘパリン結合ドメインの cBNA断片をベクターに接続するための 5 ′ 側(植長 63及び 55、第 1 図参照)及び 3 ′ 網(植長 25及び 33、第 1 図参照)のアダプターをアプライドバイオシステムズ社の DNA合成機を用いて合成した。各々 2 μ 8 の 5 ′ 末端をリン酸化した後、アニーリング操作により、 2 重積とした。

(1-2) Ncol-Sacl 断片の興製

取和性 FNのH-271 をコードする cBHA断片を含む 5.9kbのプラスミドpLF2435 [バイオケミストリー第 25巻、第 4936~4941頁 (1986)] 100 μg を BamH L 及び Sac I で分解し、アガローされな スゲル電気泳動にかけ、1.2 kbの断片を回収した。この断片を更に Hae D で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.46kbの Hae U

した。反応被を65℃、10分処理した後、Bamill 及び Saclで分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.30kbの Sacl-Bamill 断片約65mgを回収した。

(l-4) Ncol - Basill 断片の調製

(1-2) で得た NcoI-SacI 断片 120ngと (1-3) で得た SacI- Bamill 断片 65ngをT4
DNA リガーゼ用バッファー、0.5mM ATP、10
mM DTT及び 2.8ユニットのT4 DNAリガーゼを
合む20μ2の反応故中、16で、一夜インキュベートした。反応故を65で、10分処理した後、
Bamill 及び NcoI で分解し、アガロースゲル
電気泳動にかけ、0.82kbの NcoI - Bamill 断
片約28ngを回収した。

(1-5) pUC118NTの構築

分泌型発現ベクター plNロ-oaph, [ジェンボ ジャーナル、第3巻、第2437~2442頁 (1984)] 1 μ g を Bamil I 及び Sal I で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1pp ターミネーター配列を含む 0.95kbの Bamil 1 - Sal I 断

片を回収した。この断片 30 ngをあらかじめ BamH I 及び Sall で分解して脱りン酸したブラスミド pUCli BN 30 ngと共に T4 DNAリガーゼ用パッファー、 0.5 mN ATP、 10 mN DTT 及び 2.8ユニットの T4 DNAリガーゼを含む 20 μ l の反応被中、 16 で、一夜インキュベートした。反応被 10 μ l を用いて大腸 菌 11 B1 D1を形質 転換し、 1pp ターミネーター配列をもつプラスミドを得、 pUCli BNTと命名した。

なお、pUC118M は、市販のpUC118ベクター 「宝活造(株)販売」の翻訳開始コドン部位 に Ncol サイトを導入し、更にリポソーム結 合部位と開始コドンの距離を 8 塩基にしたも のである。

(1-6) Ncoi - Bamil 断片のpUC118HTへのクロ ーニング

(1-5) で得たプラスミドpUCliBNT 0.1µg を Ncol及びBamillで分解後、脱リン酸した。 このプラスミド20ngを(1-4) で得た Ncol-Damil 断片 20ng と共にT4 DNAリガーゼ用バ

示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した [微工研条寄第2264号 (FBRN DP-2264)]。

(1-8) 租換え体からのペプチドの精製

(1-7) で得た Bscherichia coli ||B101/ pKB101を50μg/虻のアンピシリンを添加した 5 配のレーブロスを含む試験管で37℃、一夜 振とう培養した。これを 500mlの同培地を含 む 2 2 の三角フラスコに接種し、100rpmで培 養を続けた。660nm の吸光度が 0.3の時点で 2 mlkの lPTG (イソプロピルー月ーチオガラク シド)を添加し、20時間後に集留した。餡体 の一部を用いてイムノブロッティングを行っ た。すなわち、全関体タンパク質をSDS-PAGE で分無し、泳動パターンをニトロセルロース メンプランに転写した後、PNのへバリン結 合ドメインを特異的に認識するモノクローナ ル抗体〔 IST-1、セラーラブ(Sera-Lab) 社 販売〕を作用させ、次いでパーオキシダーゼ 標準第2抗体を作用させた。結合した第2抗 ッファー、 0.5 a M ATP 、 10 a M DTT 及び 2.8 ユニットの T4 DNAリガーゼを含む 20 μ ℓ の 反応 k 中、 16 ℃、 一夜 インキュベート した。 この 反応 k 10 μ ℓ を 大路 協 HB101の 形質 転換 に 使用した。

また、このプラスミドを保持する大脇図 III 101 を Bscherichia coli HB101/p||D101と表

体のパーオキシダーゼ活性を4-クロロー1 ーナフトールと過酸化水素の存在下で発色さ せ、29kD付近に目的のペプチドが生産されて いることを確認した。次に、全菌体ペレット を20mM KallPO4 (pH 7.0)、 1 mM BDTA 、 5 mM メルトカプトエタノール、3 4 1 1 1 1 7 7 ミジ **ノフェニルメタンスルホニルフルオライド** (p-APNSF)を含む熔液に懸濁して、超音波処 理を行った。12000 rpm で20分遠心して、上 清 25 m を 得 た。 これを、 20m M KaHPD。 (pH 7: 0) パッファーで平衡化したCM-トョパール 650Mのカラム(15配)に通した。同一パッ ファーで非吸者画分を除いた後、0.15M NaC l を含む20mM K₂HPB₄ (pH 7.0)パッファーで 俗出し、分面した。俗出版のイムノブロッテ ィングを行い、目的面分を集めた。次にこの 西分を0.15M NaCl を含む20mk XallPO。(pH 7.0)パッファーで平衡化したヘパリンート ョパール 650Mのカラム (80㎡) に通した。

カラムを 0.2M NaCl を含む20 mM KallPOa (pli

特別平2-311498 (8)

7.0)バッファーで洗浄後、20 ml KaRPO。(pli 7.0)パッファー中、0.2 M NaC1 から0.45M NaCl の直線波度勾配による溶出を行い、分 酒した。イムノブロッティングにより目的酒 分を集め、脱塩、凍結乾燥して、電気水動的 にほぼ単一なペプチド約20mgを得た。ABI 社のペプチドシーケンサー477A/120Aを用い て、本ペプチドのN末端からのアミノ放配列 を調べたところ、Ala -lle-Pro-Ala-Pro-Thr -Asp-Louの配列が認められ、目的のペプチド のN末端配列と一致した。また、カルポキシ ペプチダーゼP(宝酒造)消化法により、C 末端はThrであることが確認された。

実施例2

F N の II cs領域の 一部 (Asp '**'-Thr '***、25 アミノ酸残器)を含むヘパリン結合ドメイン 【Alalano-Thriss 、296 アミノ残基、以下ボー 296 と略称する)をコードするcDNA断片のクロ ーニング (第2図参照)

(2-1) Ban II — Baull I 断片の調製

490 agをT4 DNA リガーゼ用パッファー、 16℃、一夜インキュベートした。この反応液 0.5mm ATP、IOmM DTT及び 2.8ユニットのT4 DNA リガーゼを含む2Dμ Lの反応核中、16℃、 一枚インキュペートした。反応核を65℃、10 分処理した後、Bamili及び Saclで分解し、 アガロースゲル電気泳動にかけ、0.38kbの Sacl-Baull 断片的 100ngを回収した。

(2-3) pHD10·1の SacI-BanHI断片(ベクター 斯片)の麒製

H-271 をコードするプラスミド pH0101の 1 A B を Sacl及びBamillで分解し、脱リン酸 した後、アガロースゲル電気泳動にかけ、 4.6kb の Sacl-Bambi ベクター断片約280 ngを回収した。

(2-4) :Sac I -Bamil I 断片とベクターの結合 (2-2)で得た0.38kbの SacI - Bass!! | 断片50 ngと、(2-3) で得た4.6 kbの Sac I + DamH! ベクター断片 20ngをT4 DHAリガーゼ用パッフ ァー、 0.5mm ATP 、 10mm DTT及び 2.8ユニッ トのT4 DMAリガーゼを含む20μ Lの反応被中、

FNの目caの CSI領域〔ジャーナル オブ セル バイオロジー (J. Cell Bio.)第103 巻、第2637~2647頁(1986)] をコードするDN A 断片を含む合成 DNA (旗長77及び78、第2 図参照)をアプライドバイオシステムズ社。 の DNA 合成概を用いて合成した。各々 2 μ g の 5′ 末端をリン酸化した後、アニーリング 提作により、相補的な配列部分を2 重額とし た。このDNA を 7 mMトリス (Tris)-||Cl(p|| 7.5) . C. InN BDTA. 20am NaCl . 7 mM MgCl, 、O.lmM dATP、dGTP、dCTP、dTTP及び · 2 ユニットのクレノウ酵素を含む 100μ L の 反応被中、37℃、30分インキュペートした。 70℃、5分で反応を停止した後、Banfil 及び BanIIで分解し、アガロースゲル電気氷動に かけ、0.11kbの Banl - BanH I 斯片的 400ngを 回収した。

(2-2) Sacl-Bamil 断片の調製

(2-1) で得た Bans - Bans I 断片 200ngと、 (1-3) で得た0.27kbの Sacl - Ban I 断片

10 M L を大腸園HO101 の形質転換に使用した。 (2-5)大腸園の形質転換とプラスミドの磁器

(2-4) で得た反応故10点』を用いて大脇閣 | HB101|| を形質転換した。得られた形質転換体 中12クローンについてブラスミドの分析を行 った。すなわち、ラピット法で調製したプラ スミドをBamll及び Ncolで分解し、アガロ ースゲル電気泳動にかけ、予想される Acol - Baall 断片 (0.9kb) のパンドの生成を飄べ た。その結果、1クローンに目的のパンドが ねめられた。また、ダイデオキシ法により塩 基配列を決定し、目的の配列を含むことを確 返した。この祖後え体プラスミドをJID102と 4名した。

また、このプラスミドを保持する大脳関HB 101 をBscherihia coli ||B101/p||0102と表 示し、工業技術院微生物工業技術研究所に密 託した (数工研胞寄第 10721号(PBRN P-107 21)] 。

(2-6) 組換え体からのペプチドの精製

(2-5)で得たBscherichia coli HD101/pHD 102 を、(1-8) と同様の方法で培養、特製し、500 型の培養被から電気泳動的にほぼ単一なペプチド約 5 mgを得た。ABI社のペプチドシーケンサー477A/120Aを用いて、本ペプチドのN末端からのアミノ酸配列を調べたところ、目的のペプチドのN末端配列と一致した。また、カルポキシペプチダーゼP消化法により、C末端はThr であることが確認された。

実施例3

(3-1) 粗胞接着ドメインProtate - Serisis (277) アミノ散残基)をコードするプラスミドの構築

特額昭 63 - 31820 号明和書に記載されている組換え体プラスミド pTF7021 の翻訳領域の

また、このプラスミドを保持する大脇歯HB 101 を Bacherichia coli ||B101/pC|| 101と 表示し、工業技術院数生物工業技術研究所に 客託した [数工研菌客第 10722号 (FBRM P-10 722)]。

(3-4) pCH101からの介在配列 (ATG) の除去 (3-3)で得たプラスミド pCH101によって発 現される融合タンパク質 (Czzz-Net-Hzzz)

(3-2) pH0101の Ncol-HincI 断片の調製
(1-7) で得た組換え体プラスミド pH0101
の1μg を Ncol及びHincI で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1.77kbの Ncol-HincII 断片約100ng を回収した。

(3-3) pH0101の Ncol - Hincl 断片のpTF7520 へのクローニング

の 和 的 接着 ドメイン Pro'232-Ser'5'5 (277 T) 以 残 基) と N-271 の 間 に は Net が 付 加 され で いる。この Net に 対 応 する 配 列 (ATG) を 部 位 特 異 の 手 祛 に よ り 除 去 し た。 p C II 101 からの 介 在 配 列 (ATG) の 除 去 は、 オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド d [p AG G A AT AG C G G AT G G T T T] を 合 成 し、 サ イ ト ー ダ イ レ ク テ ッ ド 「 ミュータン ー K 〔 東 A で 石 か な で 行 っ た。 そ の 結 果 で が な 来 シ ス テ ム 「 こ 7 7 7 7 8 で で で な な と H-271 が 直 接 結 合 し た 融 合 タ ミ ド を 段 、 p C II 201 と 命 名 し た。

(3-5) 組換え体からのペプチドの特製

同様の方法で精製して15mgの精製品を得た。 本ペプチドのN末端配列は目的ペプチドの配列と一致した。また、カルボキシペプチダー ゼア消化法により、C末端はThr であること を確認した。

実施例 4

FNの離脱接着ドメインPro'***-Ser'*'*
(277アミノ酸残基) とII-296 との融合タンパク質をコードするcDHA断片のクローニング (第 4 図参照)

(4-1) pHD102の Ncol - HincI 断片の調製 (2-5) で得られた組換え体プラスミドpHD 102 の 1 μg を Ncol 及びHincI で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、1.84kbの Ncol - HincI 断片約100ng を回収した。

(4-2) pHD102の NcoI - HincI 斯片のpTF7520 へのクローニング

(3-1) で得たプラスミドpTF7520 を Nco I 及びHinc II で分解後、脱リン酸した。このプ ラスミド 50ngを (4-1) で得た Nco I -Hinc II

除去を(3-4) と同様の方法で行った。その結果、抑胞接着ドメインPro'***-Ser'*'* (277 アミノ酸残基) とH-296 が直接結合した融合タンパク質 (C***-H****) を発現するプラスミドを得、pCH202と命名した。

(4-4) 組換え体からのペプチドの精製

(4-2) で得たBscherichia coli ||B101/pC||
102 を(3-5) と同様の方法で培養、精製し、
500 単の培養液から、電気泳動的にほぼ単一
なペプチド約 6 msを得た。N末端配列分析及
びC末端分析の結果は目的ペプチドのものと
一致した。

実施例 5 生物活性の限定

前記実施例1~4で得られた各ポリペプチドを用いて細胞接着活性及びヘバリン結合活性を 創定した。

和政技者活性は、ルオスラティらの方法(メソッズ イン エンザイモロジー、第82巻、第803~831 頁 (1981))に単じて制定した。試料を裏留水、、PBS(リン酸級質化生型食塩水)

また、このプラスミドを保持する大脳図IIB 101 をBacherichia coli IIB101/pCH102 と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した「微工研菌寄第 10723号 (FBRM P-107 23)]。

(4-3) pCH102からの介在配列 (ATG) の除去 (4-2) で将たプラスミドpCH102によって発現される融合タンパク質 (C****-Het-II****) の細胞接着ドメインProl****-Ser'*'* (277 でミノ酸残蓄) とH-296 の間には Metが付加されている。この Metに対応する配列 (ATG) の

答に格かし、96穴マイクロブレート上で階段的 に看訳した。4 ℃、2 時間インキュペートして、 試料をプレート上に敷着させた(50×12/ウェ ル)。 3 % B S A (牛血清アルブミン)を含む PBS格液を 100μ1/ウェル加え、37℃、1 時間インキュベートしてプレートをブロックし た。PBSでプレートを洗浄後、あらかじぬダ ルペッコ (Dulbecoo's)イーグル最小栄養培地 (DNBN)に 5 × 10° 細胞/ Wとなるように懸濁さ せたベビーハムスター腎細胞 (BHK-21) を100 µ L / ウェル分柱し、37℃、1 時間インキュベ ートした。なお使用したBIIK-21細胞は、凍結保 存した株を離代培養後、トリプシン処理(37℃、 5分) したものを用いた。PBSでプレートを 洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート 上に固定した。

顕数額下でBHK-21和的の仲展を観察し、仲展 細胞数が、n-PNの高濃度における仲展知的数の 50%となる試料の濃度(BDse)を求め細胞接着 活性の指標とした。

待閉平2-311498 (11)

へパリン結合括性の孤定は以下のようにした。
20 mk リン酸パッファー (ph 7.0) で平衡化
した A F へパリンートョパール 650Mのカラム
(1.5㎡) に試料を乗せ、パッファー中のHaCl複
皮を段階的に上昇させ、溶山される塩煮度によりへパリンへの結合力を表した。

、以上の方法で各試料の生物活性を測定した結果を第1 表に示す。

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	第	1		
試	料	和 B D s	(中) (A)	活性(1/此)	ヘバリン 結合.活性 (俗出塩設度、all)
H - 271	-		なし	•	300
H - 296			4.1		300
C177-Ket	-11-11	(0.17	6	300
C:11-Net	-H200		0.08	4	300

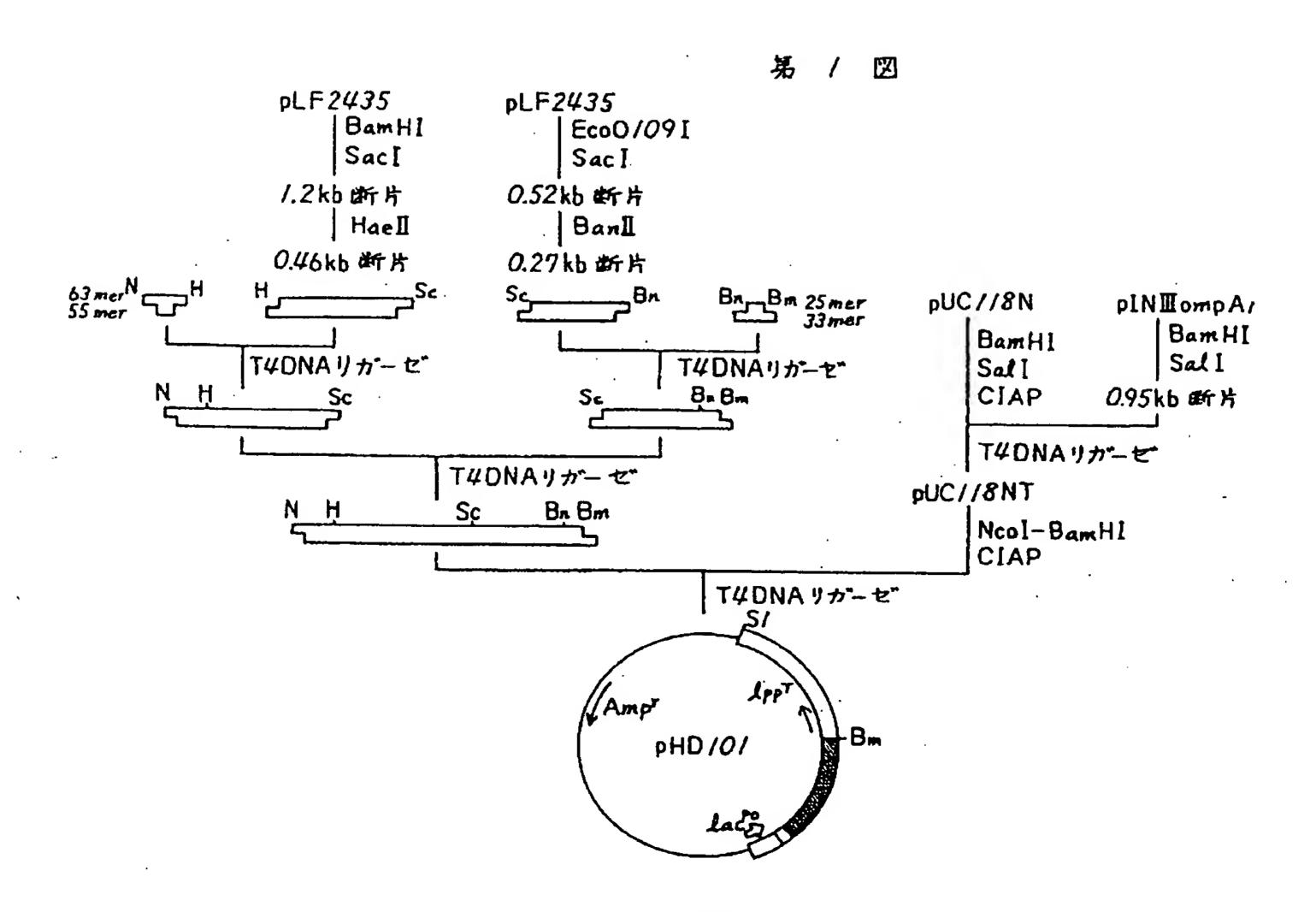
〔発明の効果〕

以上述べてきたごとく、本発明により、細胞接着活性とヘバリン結合活性の両活性を合せ持つ新規ポリペプチド及びその製造法が提供される。このポリペプチドは細胞とヘバラン硫酸な

どの細胞外マトリックスとの結合の仲立ちをし、 創傷治療等に役立つ有用なタンパク質である。 4. 図面の簡単な説明

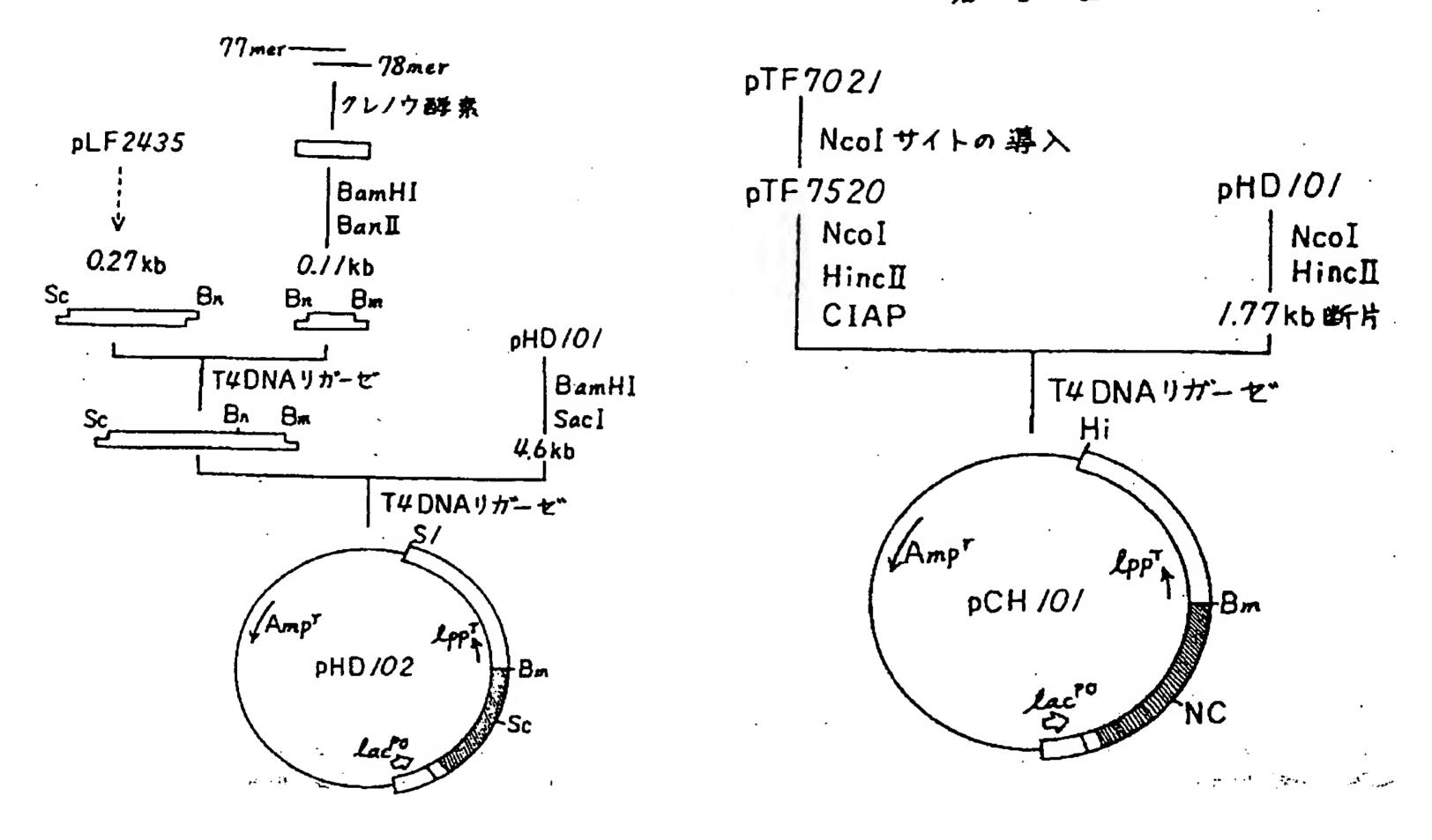
第1 図は N-271 を発現するプラスミド pHD101を構築するための工程図、第2 図は N-296 を発現するプラスミド pHD102を構築するための工程図、第3 図は C211-Net-H211 を発現するプラスミド pCH101を構築するための工程図、第4 図は C211-Net-H211 を発現するプラスミド pCH102を構築するための工程図である。

* 5	午出事	人員	賽花	适	栨	式	会	社
代	理	人	中	本	•		宏	
	周		井	上			昭	
	昌	-	古	· 26			桂	

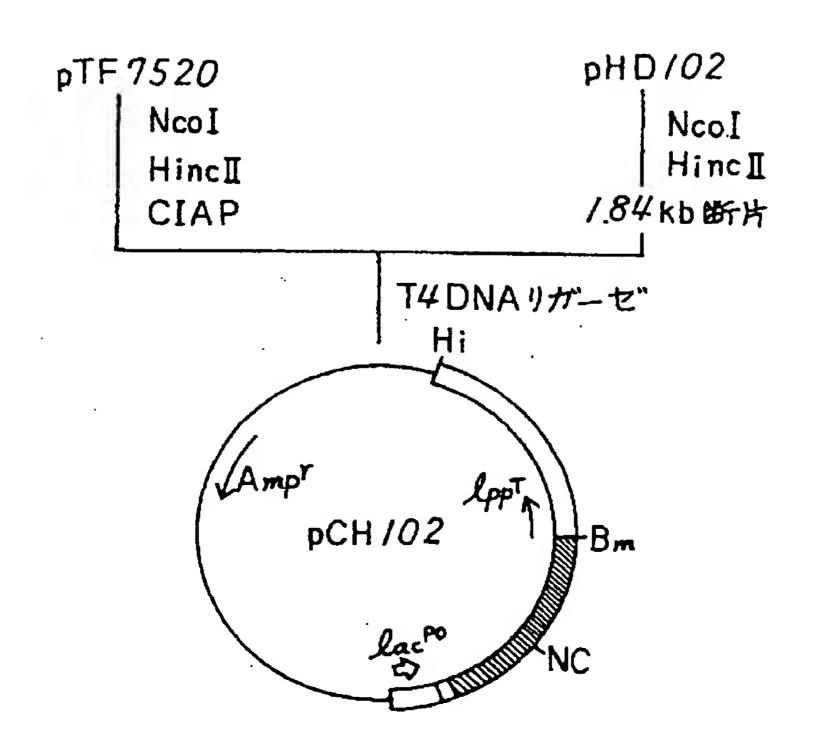


第 2 図

第 3 四



第 4 区



第1頁の続き

②発明者 君塚 房夫 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社中央研究所内

回発明者 加藤 郁之進 送賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研

究所内

手続補 正杏 (自発)

平成1年7月 , 日

特許庁長官 吉田文 穀 殿

1.事件の表示 平成1年特許顯第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチャ

3. 槌正をする者

特許庁 1. 7. 4

事件との関係 特許出額人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名称 實 酒 造 株 式 会 社

代表者 田 辺 哲

4.代 理 人

每105 住所 東京都港区西新橋 3 丁目 15番 8 号

西新橋中央ビル302号 電話(437)3467

氏 名 弁理士(7850)

(ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正の対象

方式 図

(1) 明報書の発明の詳細な説明の欄

7. 植正の内容

明知者の発明の詳細な説明の概を下記のとお り補正する。

- (1) 明細音第18頁1~2行の「(1ST・・・ が一社)」を下記のとおり補正する。
 - 「[IST-1 又はIST-2 、セラーラブ (Seralab) 社販売]」
- (2) 同第25頁下から3~2行の「〔!ST-1 · · ・販売〕」を下記のとおり補正する。 「(iST-1、セラ-ラブ社販売)」
- (3) 同第29頁下から4行の「Sacl+Bamil」」 を「Sacl-Bamil」と補正する。
- (4) 同第30頁下から4行の「Escherihia」を 「Escherichia 」と補正する。

待周平2-311498 (14)

明知者の発明の辞額な説明の費を下記のとお

・・2)〕。」なる全文を下記のとおり補正

「客託した〔数工研条客第2799号(PERM BP

。」なる全文を下記のとおり補正

岡第36頁下から8~7行の「託し

「託した【数工研条寄第2800号(FBRM BP

手 (自発) Œ

平成2年4月12日

特許庁長官

- 1.事件の表示
- 2.発明の名称
- 3. 組正をする者

事件との関係 **特許出顧人**

京都府京都市伏見区竹中町 6 0 9 番地 住

代表者 田 辺

4.代 理 人

住 所

4 105 東京都港区西新福 3

氏 **弁理士 (7850)**

(ほか2名)

- 5. 補正命令の日付
- 6. 補正の対象

6. 旧受託番号

7. 補正の内容

り補正する。

する。

する。

- 2 7 9 9)) . j

2800)] . . .

数工研磨密第10722号

7. 新客託機関の名称:

工業技術裝徵生物工業技術研究所

8. 新妥託番号

· 数工研集客第2799号

- 9. 添付書類の目録
 - (1) 新受託番号を証明する音面

受託番号変更届

平成2年4月12日

特許庁長官 吉田文教教

1.事件の表示 平成1年特許顧第131453号

2.発明の名称

3.手続をした者

事件との関係 人頭出往幹

105

京都府京都市伏見区竹中町 6 0 9 番地

實 酒 遊 株 式 会

代表者 田 辺

4代 理 人

東京都港区西新橋 3 丁目 15 举 8 号

西新橋中央ビル302号

電話 (437) 3467

氏 名

弁理士 (7850)

(ほか2名)

5. 旧寄託機関の名称

工業技術院數生物工業技術研究所

受 託 器 号 変 更 届

平成2年4月 12 日

特許庁長官 吉田文 敬 殿

1. 事件の表示 平成1年特許額第131453号

2. 発明の名称 機能性ポリペプチド

3.手被をした者

事件との関係 特許出額人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町 6 0 9 番地

名称 實酒造株式会社

代表者 田 辺 哲

4. 代 理 人

住所 東京都港区西新福 3 丁目 15番 8 号

西新橋中央ビル302号

筮話(437)3467

氏 名 弁理士(7850)

中本



(ほか2名)

5. 旧客託級関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所-

2. 4.12

6. 旧要託署号

'数工研阅客第10723号

7. 新容託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

8. 新受託書号

微工研条寄第2800号

9. 添付書題の目録

(1) 新受託番号を証明する書面

1 通

```
【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載・
```

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年(1994)12月6日

【公開番号】特開平2-311498

【公開日】平成2年(1990)12月27日

【年通号数】公開特許公報2-3115

【出願番号】特願平1-131453

【国際特許分類第5版】

CO7K 13/00 ZNA 8318-4H C12N 1/21 7236-4B 15/62 15/70 C12P 21/02 C 8214-4B // A61K 37/02 8314-4C (C12N 1/21 C12R 1:19 (C12P 21/02 C12R 1:19 [FI] C12N 15/00 A 9050-4B

手 続 補 正 書 (自免)

平成6年6月30日

特許庁長官 麻 生 放 股

1. 事件の表示 平成し年特許順節131453号

2. 強明の名称 機能性ポリペプチド

A STATE OF THE STA

3. 前正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都府京都市仅见区竹中町609番地

名称 黄酒造株式会社

代表者 大 宮 久 (代表者変更)

4. 代 壁 人

〒105

住 所 東京都港区西新橋 3 丁目 1 5 卷 8 号

西新橋中央ビル302号 電話(3437)3467巻

(ほか2名)

- 5. 確正命令の日付 自発補正
- 6. 雑正により増加する請求項の数
- 7. 補正の対象
- (1) 明細書の特許請求の範囲の翻
- (2) 明如春の発明の詳細な説明の間
- 8. 植正の内容
 - (1) 明期書の特許請求の範囲の概を別紙のとおり請正する。
 - (2) 明和古の発明の詳細な説明の確を下記のとおり前正する。
 - ア、明和喜節5貫下から3行の「を含む・・・その」なる金文

を下記のとおり抽正する。

「を含有する新規な機能性ポリペプチド、並びにそれらを コードする遺伝子、及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な」 イ、同第8頁5~8行の「プチド・・・ 政府」なる全文を下記 のとおり補正する。

「プチドに関し、第2の発明は、第1の発明の新規な機能性ポリペプチドをコードする選伝子に関する。本発明の第3の発明は、前記ポリペプチドをコードする遺伝子を含有せしめた机機之体プラスミドに関し、また第4の発明は、前記組機之体プラスミドを導入せしめた形質転換体に関し、更に第5の発明は、前記形質転換体を培養し、散培」

ウ. 同事39頁下から2行の「つ新・・・され」なる全文を下 記のとおり撤正する。

「つ新規ポリペプチド、並びにそれらをコードする遺伝子、 及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な製造方法が提供され」

-1-

2.特許請求の範囲

し ヒトフイプロネクチンの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合 ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合している ことを特徴とする機能性ポリペプチド。

2 下記一般式1:

Cini ← Met → Hin - X ···([]) 〔式中Cini は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインの Pro └ └ - Ser └ ! いに相当する277Tミノ酸ペプチド段 払を示し、下記式 II:

Pro The Ash Leu Are Phe The Ash He Gly Pro Asp The Wet Arg Val The Trp Ala Pro Pro Pro Ser IIc Asp Lou The Ash Pho Lou Val Arg Tyr Scr Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Lou Ser 11s Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Lou The Asn Lou Lou Pro Gly The Glu Tyr Val Yal Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gla His Clu Ser The Pro Lou Arg Gly Arg Gin Lys Thr Gly Len Asp Ser Pro Thr Gly Ilo Asp Phe Ser Asp Ile The Ala Ash Ser Phe The Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala The 11c The Gly Tyr Arg tle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser He The Leu The Asn Lou The Pro Gly The Glu Tyr Val Val Ser Ilo Val Ala Leu Asn Gly Arm Glu Glu Ser Pro Leu Lou ilo Gly Gin Gin Ser Thr Val Ser Asp

The Cly Len Glo Pro Gly The Asp Tyr Lys lie Tyr Gly Len Glo Pro Gly The Asp Tyr Lys lie Tyr Leu Tyr The Leu Aso Asp Aso Ala Arg Sor Sor Pro Yal Val lie Asp Ala Sor The Ala lie Asp Ala Pro Sor Aso Leu Arg Pho Leu Ala The The Pro Aso Sor Leu Lau Val Sor Trp Glo Pro Pro Arg Ala Arg lie The Gly Tyr Ile lie Lya Tyr Glo Lya Pro Gly Sor Pro Pro Arg Glo Val Val Pro Arg Pro The Gly Sor Pro Gly Val The Glo Ala The Ile The Gly Leu Glo Pro Gly The Glo Ala The Ile The Gly Leu Glo Pro Gly The Glo Tyr The Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Aso Glo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Glo Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Aso Glo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Glo Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Aso Glo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Clu Tyr The Cha Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Clu Tyr The Cha Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Clu Tyr The Cha Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Clo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Clu Tyr The Cha Tyr The Clu Tyr The Cha Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Aso Clo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Clu Tyr The Cha Tyr The Cha Tyr Val Ile Ala Leu Lya Aso Aso Clo Lya Sor Glo Pro Lou Ile Gly Arg Lya Lya The Cha Tyr The Ch

で表される配例を有し、Xは下記近で: Asp-Glu-Lou-Pro-Gln-Lou-Val-Thr-Lou-Pro-Mis-Pro-Asn-Lou-His-Gty-Pro-Glu-llo-Lou-Asp-Val-Pro-Sor-Thr … (IV)

で扱されるペプチド残基、あるいはその一部又は全部が欠失した基を示し、Metはメチオニン投掘を示し、nは1又は零の数を示す〕で汲されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

- 3. 請求引し記載の機能性ポリペプチドをコードする遺伝子。
- ・ 請求項3記載の機能性ポリペプチドをコードする遺伝子を含 存せしめた抵換え体プラスミド。
- 5. 請求項<u>4</u>配載の組換え体プラスミドを得入せしめた形質転換体。
- 6. 請求項5.記載の形質伝換体を培養し、減培要物より請求項1

The Pro Are Asp Lou Giu Yai Yai Ala Ala
The Pro The See Leu Lou IIo See Try Asp
Ala Pro Ala Vai The Vai Are Tyr Tyr Are
Ito The Tyr Giy Giu The Giy Giy Asm Sor
Pro Vai Gin Giu Phe The Yai Pru Giy Sor
Lya See The Ala The IIo See Giy Lou Lya
Pro Giy Vai Amp Tyr The IIc The Vai Tyr
Ala Vai The Giy Are Giy Aup See Pro Ala
See See Lya Pru IIo See Iio Asm Tyr Are
The Giu Iio Asp Lya Pro Sur ... (II)

で扱きれる配列を打し、Hini はヒトフィブロネクチンのヘパリン結合ドメインのAia '***-Thr'***に相当する271アミノ酸ペプチド及弦を示し、下記式正:

Ala lie Pro Ala Pro Tur Asp Leu Lys Phe
Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala
Gin Trp Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
Lys Thr Giy Pro Net Lys Giu lie Asn Lou
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Giu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Gin Giy Val Val Thr Thr
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
Arg Val Tur Asp Ala Thr Glu Thr Thr lie
Thr lie Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr

記載の機能性ポリペプチドを採取することを特徴とする機能性 ポリペプチドの製造方法。